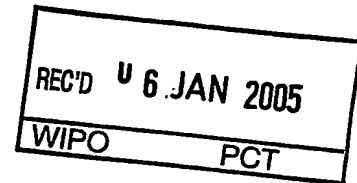


EP04/13664



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Aktenzeichen: 103 59 351.9

Anmeldetag: 16. Dezember 2003

Anmelder/Inhaber: Merck Patent GmbH,
64293 Darmstadt/DE

Bezeichnung: DNA-Sequenz und rekombinante
Herstellung von Gruppe-4 Majorallergenen
aus Getreiden

IPC: C 07 K, C 12 N, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 16. September 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

**Merck Patent Gesellschaft
mit beschränkter Haftung
64271 Darmstadt**

**DNA-Sequenz und rekombinante Herstellung
von Gruppe-4 Majorallergenen aus Getreiden**

DNA-Sequenz und rekombinante Herstellung von Gruppe-4 Majorallergenen aus Getreiden

5

Hintergrund der Erfindung

10

Die vorliegende Erfindung betrifft die Bereitstellung von DNA-Sequenzen von Gruppe-4 Majorallergenen aus Getreiden (*Triticeae*). Die Erfindung schließt auch Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Punktmutanten mit hypoallergener Wirkung ein. Die rekombinanten DNA-Moleküle und die abgeleiteten Polypeptide, Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Varianten können zur Therapie von pollenallergischen Krankheiten genutzt werden. Die rekombinant hergestellten Proteine können zur *In-vitro*- und *In-vivo*-Diagnostik von Pollenallergien eingesetzt werden.

20

Allergien vom Typ 1 haben weltweite Bedeutung. Bis zu 20 % der Bevölkerung in industrialisierten Ländern leiden unter Beschwerden wie allergischer Rhinitis, Konjunktivitis oder Bronchialasthma. Diese Allergien werden durch in der Luft befindliche Allergene (Aeroallergene), die von Quellen unterschiedlicher Herkunft wie Pflanzenpollen, Milben, Katzen oder Hunden freigesetzt werden, hervorgerufen. Bis zu 40 % dieser Typ 1-Allergiker wiederum zeigen spezifische IgE-Reaktivität mit Gräserpollenallergenen, unter anderem Getreidepollenallergenen (Freidhoff et al., 1986, J. Allergy Clin. Immunol. 78, 1190-2001). Eine besondere Bedeutung unter den Getreidepollenallergenen besitzen die Allergene von Roggen.

30

35

Bei den Typ 1-Allergie auslösenden Substanzen handelt es sich um Proteine, Glykoproteine oder Polypeptide. Diese Allergene reagieren nach Aufnahme über die Schleimhäute mit den bei sensibilisierten Personen an der

- 2 -

Oberfläche von Mastzellen gebundenen IgE-Molekülen. Werden zwei IgE-Moleküle durch ein Allergen miteinander vernetzt, führt dies zur Ausschüttung von Mediatoren (z. B. Histamin, Prostaglandine) und Zytokinen durch die Effektorzelle und damit zu den entsprechenden klinischen Symptomen.

5

In Abhängigkeit von der relativen Häufigkeit mit der die einzelnen Allergenmoleküle mit den IgE-Antikörpern von Allergikern reagieren, wird zwischen Major- und Minorallergenen unterschieden.

10

Die Allergene aus den Pollen von verschiedenen Spezies aus der Familie der Gräser (*Poaceae*) werden in Gruppen eingeteilt, die untereinander homolog sind.

15

Insbesondere die Moleküle der Majorallergengruppe 4 weisen untereinander eine hohe immunologische Kreuzreaktivität sowohl mit monoklonalen Mausantikörpern als auch mit humanen IgE-Antikörpern auf (Fahlbusch et al., 1993 Clin. Exp. Allergy 23:51-60; Leduc-Brodard et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98:1065-1072; Su et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 97:210; Fahlbusch et al., 1998, Clin. Exp. Allergy 28:799-807; Gavrovic-Jankulovic et al., 2000, Invest. Allergol. Clin. Immunol. 10 (6):361-367; Stumvoll et al. 2002, Biol. Chem. 383:1383-1396; Grote et al., 2002, Biol. Chem. 383:1441-1445; Andersson und Lidholm, 2003, Int. Arch. Allergy Immunol. 130:87-107; Mari, 2003, Clin. Exp. Allergy, 33 (1):43-51).

20

25

Von keinem der Gruppe-4-Majorallergene ist bisher eine vollständige DNA-Sequenz bekannt.

30

Von dem Gruppe-4 Allergen aus *Dactylus glomerata* sind bisher lediglich Peptide durch enzymatischen Abbau gewonnen und sequenziert worden:

DIYNYMEPYVSK,

VDPTDYFGNEQ,

35

ARTAWVDSGAQLGELSY

- 3 -

und GVLFNIIQYVNYWFAP (Leduc-Brodard et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 1065-1072).

Auch vom Gruppe-4 Allergen des subtropischen Bermuda-Grases (*Cynodon dactylon*) sind durch Proteolyse Peptide erhalten und sequenziert worden:

KTVKPLYIITP,

KQVERDFLTSLTKDIPQLYLKS,

TVKPLYIITPITAAMI,

LRKYGTAADNVIDAKVVDAQGRLL,

KWQTVAPALPDPNM,

VTWIESVPYIPMGDK,

GTVRDLLXRTSNIKAFGKY,

TSNIKAFGKYKSDYVLEIPKKS,

YRDLDLGVNQVVG,

SATPPTHRSGVLFI,

und AAAALPTQVTRDIYAFMTPYVSKNPRQAYVNYRDLD (Liaw et al., 2001, Biochem. Biophys. Research Communication 280: 738-743).

Für *Lolium perenne* wurden für das basische Gruppe-4 Allergen Peptidfragmente mit den folgenden Sequenzen beschrieben: FLEPVLGLIFPAGV und GLIEFPAGV (Jaggi et al., 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89: 342-348).

Als erste Sequenz eines Allergens der Gruppe 4 wurde von den Erfindern der vorliegenden Patentanmeldung die noch unveröffentlichte Sequenz des Phl p 4 aus *Phleum pratense* aufgeklärt und in der internationalen Anmeldung PCT/EP03/06092 beschrieben.

Über die Sequenzen der Gruppe-4-Majorallergene aus Getreiden (*Triceae*) ist bisher nichts bekannt.

- 4 -

Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe bestand daher in der Bereitstellung von DNA-Sequenzen von Gruppe-4 Majorallergenen aus Getreiden, insbesondere des Allergens Sec c 4 aus Roggen (*Secale cereale*), Hor v 4 aus Gerste (*Hordeum vulgare*) und Tri a 4 aus Weizen (*Triticum aestivum*) sowie von entsprechenden rekombinanten DNA-Molekülen, auf deren Grundlage die Allergene als Protein exprimiert und einer pharmakologisch bedeutsamen Verwertung als solches oder in veränderter Form zugänglich gemacht werden kann. Die Sequenz des Phl p 4 war Ausgangspunkt für die vorliegende Erfindung.

Verzeichnis der Abbildungen

Den DNA- und Protein-Sequenzen der reifen Allergene in den Abbildungen 1 bis 6 geht eine Signalsequenz voraus, die kursiv und unterstrichen dargestellt ist. Die jeweiligen Stopcodons in den DNA-Sequenzen sind unterstrichen dargestellt. Mit ihnen endet der kodierende Bereich.

Abbildung 1: DNA-Sequenz des Sec c 4. (a) Isoform Sec c 4.01, (b) Isoform Sec c 4.02.

Abbildung 2: Von den DNA-Sequenzen gemäß Abb. 1 abgeleitete Protein-Sequenzen.

Abbildung 3: DNA-Sequenz des Hor v 4.

Abbildung 4: Von der DNA-Sequenz gemäß Abb. 3 abgeleitete Protein-Sequenz.

Abbildung 5: DNA-Sequenz des Tri a 4. (a) Isoform Tri a 4.01, (b) Isoform Tri a 4.02.

Abbildung 6: Von den DNA-Sequenzen gemäß Abb. 5 abgeleitete Protein-Sequenzen.

5

Abbildung 7: DNA-Sequenz des Phl p 4, gemäß SEQ ID NO 5 aus der PCT/EP03/06092.

10

Abbildung 8: Proteinsequenz des Phl p 4, gemäß SEQ ID NO 6 aus der PCT/EP03/06092.

Beschreibung der Erfindung

15

Mit der vorliegenden Erfindung werden nun erstmals DNA-Sequenzen der Getreidepollenhauptallergene Sec c 4, Hor v 4 und Tri a 4, wie in den Abb. 1, 3 und 5 wiedergegeben, bereit gestellt.

20

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher DNA-Moleküle ausgewählt aus den in den Abb. 1, 3 und 5 dargestellten Nukleotidsequenzen.

25

Die Erfindung betrifft weiterhin zu den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen homologe Sequenzen bzw. entsprechende DNA-Moleküle von Gruppe-4-Allergenen aus anderen *Poaceae* wie beispielsweise *Lolium perenne*, *Dactylis glomerata*, *Poa pratensis*, *Cynodon dactylon* und *Holcus lanatus*, die aufgrund der bestehenden Sequenzhomologie mit den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisieren, bzw. bezüglich der erfindungsgemäßen Allergene eine immunologische Kreuzreaktivität aufweisen.

30

Die Erfindung schließt dabei auch Fragmente, Neukombinationen von Teilssequenzen und Punktmutanten mit hypoallergener Wirkung ein.

35

- 6 -

5 Gegenstand der Erfindung sind daher weiterhin entsprechende Teilsequenzen, einer Kombination von Teilsequenzen bzw. Austausch-, Eliminierungs- oder Additionsmutanten, welche für ein immunmodulatorisches, T-Zell-reaktives Fragment eines Gruppe-4-Allergens der *Poaceae* kodieren.

10 Mit der Kenntnis der DNA-Sequenz der natürlich vorkommenden Allergene ist es nun möglich, diese Allergene als rekombinante Proteine herzustellen, die in der Diagnostik und Therapie von allergischen Erkrankungen Verwendung finden können (Scheiner and Kraft, 1995, *Allergy* 50: 384-391).

15 Ein klassischer Ansatz zur wirksamen therapeutischen Behandlung von Allergien stellt die Spezifische Immuntherapie oder Hyposensibilisierung dar (Fiebig, 1995, *Allergo J.* 4 (6): 336-339, Bousquet et al., 1998, *J. Allergy Clin. Immunol.* 102(4): 558-562). Dabei werden dem Patienten natürliche Allergenextrakte in steigenden Dosen subkutan injiziert. Allerdings besteht bei dieser Methode die Gefahr von allergischen Reaktionen oder sogar eines anaphylaktischen Schocks. Um diese Risiken zu minimieren, werden 20 innovative Präparate in Form von Allergoiden eingesetzt. Dabei handelt es sich um chemisch modifizierte Allergenextrakte, die deutlich reduzierte IgE-Reaktivität, jedoch identische T-Zell-Reaktivität im Vergleich zum nicht behandelten Extrakt aufweisen (Fiebig, 1995, *Allergo J.* 4 (7): 377-382).

25 Eine noch weitergehende Therapieoptimierung wäre mit rekombinant hergestellten Allergenen möglich. Definierte, ggfs. auf die individuellen Sensibilisierungsmuster der Patienten abgestimmte Cocktails von hochreinen, rekombinant hergestellten Allergenen könnten Extrakte aus natürlichen Allergenquellen ablösen, da diese außer den verschiedenen Allergenen eine größere Zahl von immunogenen, aber nicht allergenen Begleitproteinen 30 enthalten.

35 Realistische Perspektiven, die zu einer sicheren Hyposensibilisierung mit Expressionsprodukten führen können, bieten gezielt mutierte rekombinante Allergene, bei denen IgE-Epitope spezifisch deletiert werden, ohne die für

- 7 -

die Therapie essentiellen T-Zell Epitope zu beeinträchtigen (Schramm et al., 1999, J. Immunol. 162: 2406-2414).

5 Eine weitere Möglichkeit zur therapeutischen Beeinflussung des gestörten TH-Zell-Gleichgewichtes bei Allergikern ist die immuntherapeutische DNA-Vakzinierung. Dabei handelt es sich um eine Behandlung mit expressionsfähiger DNA, die für die relevanten Allergene kodiert. Erste experimentelle Belege für die allergenspezifische Beeinflussung der Immunantwort konnte
10 an Nagern durch Injektion von Allergen-kodierender DNA erbracht werden (Hsu et al., 1996, Nature Medicine 2 (5): 540-544).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein vor- oder nach-
15 stehend beschriebenes DNA-Molekül bzw. ein entsprechender rekombinanter Expressionsvektor als Arzneimittel.

Die entsprechenden rekombinant hergestellten Proteine können zur Therapie sowie zur *in vitro*- und *in vivo*-Diagnostik von Pollenallergien eingesetzt werden.
20

Zur Herstellung des rekombinanten Allergens wird die klonierte Nukleinsäure in einen Expressionsvektor ligiert und dieses Konstrukt in einem geeigneten Wirtsorganismus exprimiert. Nach biochemischer Reinigung steht
25 dieses rekombinante Allergen zur Detektion von IgE-Antikörpern in etablierten Verfahren zur Verfügung.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher weiterhin ein rekombinanter Expressionsvektor, enthaltend ein vor- oder nachstehend beschriebenes DNA-Molekül, funktionell verbunden mit einer Expressionskontrollsequenz und ein Wirtsorganismus, transformiert mit besagtem DNA-Molekül oder besagtem Expressionsvektor.
30

35 Ebenfalls erfindungsgegenständlich ist die Verwendung mindestens eines zuvor beschriebenen DNA-Moleküls oder mindestens eines zuvor be-

- 8 -

5
schriebenen Expressionsvektors zur Herstellung eines Arzneimittels zur immuntherapeutischen DNA-Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae*, vorzugsweise *Triti-
ceae*, insbesondere Sec c 4, Hor v 4, Tri a 4, beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

10
Wie bereits ausgeführt kann die Erfindung als eine essentielle Komponente in einem rekombinanten allergen- oder nukleinsäurehaltigen Präparat zur spezifischen Immuntherapie angewendet werden. Hierbei bieten sich meh-
rere Möglichkeiten. Zum einen kann das in der Primärstruktur unveränderte Protein Bestandteil des Präparates sein. Zum anderen kann durch gezielte
15
Deletion von IgE-Epitopen des Gesamtmoleküls oder der Herstellung von einzelnen Fragmenten, die für T-Zell Epitope kodieren, erfindungsgemäß eine hypoallergene (allergoide) Form zur Therapie verwendet werden, um unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden. Schließlich wird durch die
Nukleinsäure an sich, wenn sie mit einem eukaryontischen Expressions-
vektor ligiert wird, ein Präparat geschaffen, das direkt appliziert den allergi-
20
schen Immunzustand im therapeutischen Sinne verändert.

25
Desweiteren handelt es sich bei der vorliegenden Erfindung um die von einem oder mehreren der zuvor beschriebenen DNA-Moleküle kodierten Polypeptide, vorzugsweise in ihrer Eigenschaft als Arzneimittel.

Dabei handelt es sich um Proteine entsprechend einer der in den Abb. 2, 4 und 6 dargestellten Aminosäuresequenzen. Insbesondere handelt es sich um die reifen Proteine (ohne Signalsequenzanteil), beginnend bei den in
30
den Abb. 2 und 4 dargestellten Aminosäuresequenzen mit der Aminosäure 23 und bei den in der Abb. 6 dargestellten Aminosäuresequenzen mit der Aminosäure 22. Weiterhin betrifft die Erfindung Proteine, welche diese Aminosäuresequenzen oder Teile dieser Sequenzen enthalten,

35

Die Erfindung betrifft demgemäß auch ein Verfahren zur Herstellung solcher Polypeptide durch Kultivieren eines Wirtsorganismus und Gewinnung des entsprechenden Polypeptids aus der Kultur.

5 Ebenfalls erfindungsgegenständlich ist die Verwendung mindestens eines zuvor beschriebenen Polypeptides zur Herstellung eines Arzneimittels zur Diagnose und/oder Behandlung von Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae*, vorzugsweise *Triticeae*, insbesondere
10 Sec c 4, Hor v 4, Tri a 4, beteiligt sind sowie zur Prävention solcher Allergien.

15 Bei der Ermittlung der erfindungsgemäßen Protein- und DNA-Sequenzen wurde wie folgt vorgegangen:

Sec c 4 aus Roggen

20 1. Ausgehend von der DNA-Sequenz des Phl p 4 (PCT/EP03/06092) wurden spezifische Primer (Tab. 1) generiert, die von der Phl p 4 Sequenz abgeleitet wurden. Durch PCR mit den Primern #87 und #83 konnten fünf Klone aus Roggenpollen DNA gewonnen werden. Das diesen Klonen entsprechende, amplifizierte Sec c 4-Genfragment-1 kodiert für ein den Aminosäuren 68-401 des Phl p 4 (Abb. 8) entsprechendes Polypeptid.
25

30 2. Mit der partiellen Sec c 4-Sequenz wurde eine EST-Datenbankrecherche durchgeführt. Es konnten jedoch keine homologen Sequenzen in auf Roggen spezialisierte EST-Datenbanken gefunden werden. Statt dessen wurden einzelne, homologe, nicht überlappende EST-Fragmente in auf Gerste und Weizen spezialisierten EST-Datenbanken gefunden. Einzelne EST-Fragmente reichen in den 5'-UTR, andere in den 3'-UTR Bereich (UTR =
35 nicht-translatierter Bereich) der entsprechenden Gene hinein.

3. Aus den in den Datenbanken gefundenen EST-Sequenzen lässt sich jedoch kein komplettes Gruppe-4-Gen aus Weizen oder Gerste konstruieren, da diese Sequenzen nicht überlappen und kein homologes Gruppe-4-Gen bekannt ist. Anhand der Phl p 4-Sequenz (Abb. 7) und des in Schritt 1 erhaltenen Sec c 4-Fragmentes konnten diese EST-Sequenzen jedoch zugeordnet werden und dienten als Vorlage für die Herstellung von PCR-Primern.

4. Mit Hilfe der so hergestellten Primer #195 und #189 konnten drei Klone durch PCR erhalten werden. Der Primer #195 wurde aus einer Gerste-EST-Sequenz abgeleitet, der Primer #189 ist ein Phl p 4-spezifischer Primer und überlappt das Phl p 4-Stoppocodon sowie die Codons der 10 C-terminalen Phl p 4-Aminosäuren. Das so amplifizierte Sec c 4-Genfragment-2 kodiert für ein Polypeptid, beginnend innerhalb der Signalsequenz und endend mit der Position, die der Position 490 des Phl p 4 entspricht. Dieses Polypeptid deckt den N-Terminus von Sec c 4 ab.

5a. Drei weitere Klone wurden durch PCR mit den Primern #195 und #202 erhalten. Beide Primer wurden aus Gerste EST-Sequenzen abgeleitet. Das amplifizierte Sec c 4-Gen-3 kodiert für die korrespondierenden Aminosäuren beginnend innerhalb der Signalsequenz und endend am C-Terminus von Sec c 4.

Die komplette Sequenz des reifen Sec c 4 ist somit in der bestimmten Sequenz enthalten.

Die beiden nächsten Schritte 5b und 5c dienen der Absicherung des im Schritt 5a erhaltenen Ergebnisses:

5b. Ein weiterer Klon wurde durch PCR mit den Primern #195 und #203 erhalten. Primer #195 wurde von einer Gerste EST-Sequenz abgeleitet, Primer #203 von einer Weizen EST Sequenz. Das amplifizierte Sec c 4 Gen kodiert für die korrespondierenden Aminosäuren beginnend innerhalb der

Signalsequenz und endend am C-Terminus von Sec c 4. Die komplette Sequenz des reifen Sec c 4 ist daher in der bestimmten Sequenz enthalten.

5

5c. Ein weiterer Klon wurde durch PCR mit den Primern #195 und #198 erhalten. Auch Primer #198 Das amplifizierte Sec c 4 Gen kodiert für die korrespondierenden Aminosäuren beginnend innerhalb der Signalsequenz und endend am C-Terminus von Sec c 4. Die komplette Sequenz des reifen Sec c 4 ist daher in der bestimmten Sequenz enthalten.

10

Es wurden zwei Isoformen Sec c 4.01 und 4.02 aufgefunden. Die reifen Allergene beginnen an den in den Abb. 1 und 2 gekennzeichneten Stellen.

15

Hor v 4 aus Gerste

20

Mit Hilfe der wie zuvor beschrieben erhaltenen Sec c 4-Sequenzen konnten in EST-Datenbanken von *Hordeum vulgare* homologe EST-Fragmente gefunden wurde. Diese Fragmente überlappen jedoch nicht zu einem kompletten Gen. Anhand der gefundenen EST-Sequenzen konnten jedoch Hor v 4-spezifische Primer generiert werden, die für eine Amplifikation des Hor v 4-Gens aus genomischer DNA verwendet wurden.

25

Insgesamt wurden 15 Klone analysiert.

4 Klone wurden durch PCR mit den Primern #195 und #198 erhalten.

4 Klone wurden durch PCR mit den Primern #195 und #202 erhalten.

30

3 Klone wurden durch PCR mit den Primern #194 und #198 erhalten.

4 Klone wurden durch PCR mit den Primern #194 und #202 erhalten.

35

Die abgeleitete Proteinsequenz beginnt innerhalb der Signalsequenz von Hor v 4 und reicht bis zum C-terminalen Ende des Proteins.

Tri a 4 aus Weizen

5 Mit Hilfe der wie zuvor beschrieben erhaltenen Sec c 4-Sequenz konnten in EST-Datenbanken von *Triticum aestivum* homologe EST-Fragmente gefunden wurde. Diese Fragmente überlappen jedoch nicht zu einem kompletten Gen. Anhand der gefundenen EST-Sequenzen konnten jedoch die Tri a 4-spezifische Primer #199, #203, #204 und #206 generiert werden, die für eine Amplifikation des Tri a 4 Gens aus genomischer DNA verwendet wurden.

10 Insgesamt wurden 13 Klone analysiert.
4 Klone wurden durch PCR mit den Primern #204 und #203 erhalten.
15 4 Klone wurden durch PCR mit den Primern #204 und #199 erhalten.
3 Klone wurden durch PCR mit den Primern #206 und #203 erhalten.
4 Klone wurden durch PCR mit den Primern #206 und #199 erhalten.

20 Die abgeleiteten Proteinsequenzen beginnen innerhalb der Signalsequenz von Tri a 4 und reichen bis zum C-terminalen Ende des Proteins.
Es wurden zwei Varianten Tri a 4.01 und Tri a 4.02 aufgefunden.

25 Zur Herstellung der rekombinanten erfindungsgemäßen Allergene wurden die DNA-Sequenzen gemäß Abb. 1, 3 bzw. 5 in Expressionsvektoren (z.B. pProEx, pSE 380) eingebaut. Für die aus der Proteinsequenzierung bekannten N-terminalen Aminosäuren wurden *E. coli* optimierte Codons verwendet.

30 Nach der Transformation in *E. coli*, der Expression und der Reinigung des rekombinanten erfindungsgemäßen Allergene durch verschiedene Trenntechniken wurde die erhaltenen Proteine einem Refoldingprozess unterworfen.

5 Beide Allergene können zur hochspezifischen Diagnostik von Graspollenallergien eingesetzt werden. Diese Diagnostik kann *in vitro* durch die Detektion von spezifischen Antikörpern (IgE, IgG1 - 4, IgA) und die Reaktion mit IgE-beladenen Effektorzellen (z. B. Basophile aus dem Blut) oder *in vivo* durch Hauttest-Reaktionen und Provokation am Reaktionsorgan erfolgen.

10 Die Reaktion der erfindungsgemäßen Allergene mit T-Lymphozyten von Graspollenallergikern können durch die allergenspezifische Stimulierung der T-Lymphozyten zur Proliferation und Zytokinsynthese sowohl mit T-Zellen in frisch präparierten Blutlymphozyten als auch an etablierten nSec c 4, nHor v 4 bzw. nTri a 4-reaktiven T-Zell-Linien und -Klonen nachgewiesen werden.

15 Durch ortsgerichtete Mutagenese wurden die für die Cysteine kodierenden Triplets so verändert, dass sie für andere Aminosäuren, bevorzugt Serin, kodieren. Es wurden sowohl Varianten hergestellt, bei denen einzelne Cysteine ausgetauscht wurden, als auch solche, bei denen verschiedene
20 Kombinationen von 2 Cysteinresten bzw. alle Cysteine verändert wurden. Die exprimierten Proteine dieser Cysteinpunktmutanten weisen eine stark reduzierte bzw. fehlende Reaktivität mit IgE-Antikörpern von Allergikern auf, reagieren jedoch mit den T-Lymphozythen dieser Patienten.

25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher weiterhin ein vor- oder nachstehend beschriebenes DNA-Molekül, bei dem durch ortsgerichtete Mutagenese einer, mehrere oder alle der Cystein-Reste des entsprechenden Polypeptids gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht wurden.
30

Die immunmodulatorische Aktivität von hypoallergenen Fragmenten, die Polypeptiden mit T-Zell-Epitopen entsprechen, sowie die der hypoallergenen Punktmutanten (z.B. Cystein-Austausche) kann durch ihre Reaktion
35 mit T-Zellen von Graspollenallergikern nachgewiesen werden.

- 14 -

5 Solche hypoallergenischen Fragmente bzw. Punktmutanten der Cysteine können als Präparate zur Hyposensibilisierung von Allergikern eingesetzt werden, da sie mit gleicher Effektivität mit den T-Zellen reagieren, jedoch aufgrund der verminderten oder ganz fehlenden IgE-Reaktivität zu geringeren IgE-vermittelten Nebenwirkungen führen.

10 Werden die für die erfindungsgemäßen hypoallergenischen Allergen-Varianten kodierenden Nukleinsäuren oder die unveränderten erfindungsgemäßen DNA-Moleküle mit einem humanen Expressionsvektor ligiert, können diese Konstrukte ebenfalls als Präparate für eine Immuntherapie (DNA-Vakzinierung) angewendet werden.

15 Schließlich sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend mindestens ein zuvor beschriebenes DNA-Molekül oder mindestens einen zuvor beschriebenen Expressionsvektor und gegebenenfalls weitere Wirk- und/oder Hilfsstoffe zur immuntherapeutischen DNA-Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung
20 Gruppe-4-Allergene der *Poaceae*, vorzugsweise *Triticeae*, insbesondere Sec c 4, Hor v 4, Tri a 4, beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

25 Eine weitere Gruppe von erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen enthält anstelle der DNA mindestens ein zuvor beschriebenes Polypeptid und eignet sich zur Diagnose und/oder Behandlung besagter Allergien.

30 Pharmazeutische Zubereitungen im Sinne der vorliegenden Erfindung enthaltend als Wirkstoffe ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder einen Expressionsvektor und/oder deren jeweilige pharmazeutisch verwendbaren Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen. Hierbei
35 können die erfindungsgemäßen Wirkstoffe zusammen mit mindestens einem festen, flüssigen und/oder halbflüssigen Träger- oder Hilfsstoff und

- 15 -

gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren weiteren Wirkstoffen in eine geeignete Dosierungsform gebracht werden.

Als Hilfsstoffe sind immunstimulierende DNA oder Oligonukleotide mit CpG-Motiven besonders geeignet.

5

Diese Zubereitungen können als Therapeutika oder Diagnostika in der Human- oder Veterinärmedizin verwendet werden. Als Trägerstoffe kommen organische oder anorganische Substanzen in Frage, die sich für die parenterale Applikation eignen und die Wirkung des erfindungsgemäßen Wirkstoffs nicht negativ beeinflussen. Zur parenteralen Anwendung dienen insbesondere Lösungen, vorzugsweise ölige oder wässrige Lösungen, ferner Suspensionen, Emulsionen oder Implantate. Der erfindungsgemäße Wirkstoff kann auch lyophilisiert und die erhaltenen Lyophilisate z.B. zur Herstellung von Injektionspräparaten verwendet werden. Die angegebenen Zubereitungen können sterilisiert sein und/oder Hilfsstoffe wie Konservierungs-, Stabilisierungs- und/oder Netzmittel, Emulgatoren, Salze zur Beeinflussung des osmotischen Druckes, Puffersubstanzen und/oder mehrere weitere Wirkstoffe enthalten.

10

15

20

Weiterhin können durch entsprechende Formulierung des erfindungsgemäßen Wirkstoffs Depotpräparate - zum Beispiel durch Adsorption an Aluminiumhydroxid - erhalten werden.

25

Die Erfindung dient somit auch zur Verbesserung der *in vitro* Diagnostik im Rahmen einer Allergen-Komponenten auflösenden Identifizierung des patientenspezifischen Sensibilisierungsspektrums. Die Erfindung dient ebenfalls zur Herstellung von deutlich verbesserten Präparaten zur spezifischen Immuntherapie von Gräserpollenallergien.

30

35

- 16 -

Tabelle 1 Verwendete Primer

a) Sec c 4

Primer-nummer	Sequenz
#0083	GGCTCCCGGGGCGAACCAGTAG
#0087	ACCAACGCCTCCCACATCCAGTC
#0189	GATAAGCTTCTCGAGTGATTAGTACTTTTTGATCAGCG GCGGGATGCTC
#0195	GCTCTCGATCGGCTACAATGGCG
#0198	CACGCACTACAAATCTCCATGCAAG
#0202	CATGCTTGATCCTTATTCTACTAGTTGGGC
#0203	TACGCACGATCCTTATTCTACTAGTTGGGC

a) Hor v 4

Primer-nummer	Sequenz
#0194	GCCTTGTCCTGCCACCACGCCGCCGCCACC
#0195	GCTCTCGATCGGCTACAATGGCG
#0198	CACGCACTACAAATCTCCATGCAAG
#0202	CATGCTTGATCCTTATTCTACTAGTTGGGC

c) Tri a 4

Primer-nummer	Sequenz
#0199	CACGCACTAAATCTCCATGCAAG
#0203	TACGCACGATCCTTATTCTACTAGTTGGGC
#0204	AAGCTCTATCGCCTACAATGGCG
#0206	GGTGCTCCTCTTCTGCGCCTTGTCC

Patentansprüche

- 5
1. Ein DNA-Molekül entsprechend einer Nukleotidsequenz, ausgewählt aus einer der in den Abbildungen 1, 3 und 5 dargestellten Sequenzen.
 - 10
 2. Ein DNA-Molekül, das mit einem DNA-Molekül gemäß Anspruch 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert und von DNA-Sequenzen von *Poaceae*-Spezies abstammt.
 - 15
 3. Ein DNA-Molekül, kodierend für ein Polypeptid, welches mit den Majorallergenen Sec c 4, Hor v 4 oder Tri a 4 aus *Secale cereale*, *Hordeum vulgare* beziehungsweise *Triticum aestivum* immunologisch kreuzreagiert, und von DNA-Sequenzen von *Poaceae*-Spezies abstammt.
 - 20
 4. Ein DNA-Molekül, entsprechend einer Teilsequenz oder einer Kombination von Teilsequenzen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, welches für ein immunmodulatorisches, T-Zell-reaktives Fragment eines Gruppe-4-*Poaceae*-Allergens kodiert.
 - 25
 5. Ein DNA-Molekül, entsprechend einer Nukleotidsequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, kodierend für ein immunmodulatorisches T-Zell reaktives Fragment, dadurch gekennzeichnet, daß besagte Nukleotidsequenz durch gezielte Mutation einzelner Codons, Eliminierung oder Addition gezielt verändert wurde.
 - 30
 6. Ein DNA-Molekül gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die besagte Mutation zum Austausch eines, mehrerer oder aller Cysteine des entsprechenden Polypeptids gegen eine andere Aminosäure führt.
 - 35
 7. Ein rekombinanter DNA-Expressionsvektor oder ein Klonierungssystem, enthaltend ein DNA-Molekül gemäß einem oder mehreren der Ansprü-

- 18 -

che 1 bis 6, funktionell verbunden mit einer Expressionskontrollsequenz.

- 5 8. Ein Wirtsorganismus, transformiert mit einem DNA-Molekül gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 oder einem Expressionsvektor gemäß Anspruch 7.
- 10 9. Ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids, kodiert durch eine DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, durch Kultivieren eines Wirtsorganismus gemäß Anspruch 8 und Gewinnung des entsprechenden Polypeptids aus der Kultur.
- 15 10. Ein Polypeptid gemäß einer der in den Abb. 2, 4 und 6 dargestellten Aminosäuresequenzen, welches von einer DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 kodiert wird.
- 20 11. Ein Polypeptid gemäß einer der in den Abb. 2, 4 und 6 dargestellten Aminosäuresequenzen, entsprechend dem reifen Allergen, ausgewählt aus der folgenden Gruppe von Aminosäuresequenzen
- 25 - eine der in den Abb. 2 und 4 dargestellten Aminosäuresequenzen beginnend mit der Aminosäure 23,
- eine der in der Abb. 6 dargestellten Aminosäuresequenzen beginnend mit der Aminosäure 22.
- 30 12. Ein Polypeptid gemäß Anspruch 10 oder 11 als Arzneimittel.
- 35 13. Eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens ein Polypeptid gemäß Anspruch 12 und gegebenenfalls weitere Wirk- und/oder Hilfsstoffe zur Diagnose und/oder Behandlung von Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind.

- 19 -

14. Verwendung mindestens eines Polypeptids gemäß Anspruch 12 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Diagnose und/oder Behandlung von Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

5

15. Ein DNA-Molekül gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 als Arzneimittel.

10

16. Ein rekombinanter Expressionsvektor gemäß Anspruch 7 als Arzneimittel.

15

17. Eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens ein DNA-Molekül gemäß Anspruch 15 oder mindestens einen Expressionsvektor gemäß Anspruch 16 und gegebenenfalls weitere Wirk- und/oder Hilfsstoffe zur immuntherapeutischen DNA-Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

20

18. Verwendung mindestens eines DNA-Moleküls gemäß Anspruch 15 oder mindestens eines Expressionsvektors gemäß Anspruch 16 zur Herstellung eines Arzneimittels zur immuntherapeutischen DNA-Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

25

30

35

Zusammenfassung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Bereitstellung von DNA-Sequenzen von Gruppe-4 Majorallergenen aus Getreiden. Die Erfindung schließt auch Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Punktmutanten mit hypoallergener Wirkung ein. Die rekombinanten DNA-Moleküle und die abgeleiteten Polypeptide, Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Varianten können zur Therapie von pollenallergischen Krankheiten genutzt werden. Die rekombinant hergestellten Proteine können zur *In-vitro*- und *In-vivo*-Diagnostik von Pollenallergien eingesetzt werden.

10

15

20

25

30

35

Abbildungen

5 **Abbildung 1(a)**

AACTATAGGGCTTCGCGTTGGCGTCCTCTTCTGCGCTTGTCCTG

CCAAGCCGCCGCGGCCGCCTACGCGCCCGTGCCTGCCAAGGCGGACT

10 T C C T C G G A T G C C T C A T G A A G G A G A T A C C G G C C C G C C T C C T C T A C G C C

A A G A G C T C G C C T G A C T A C C C C A C C G T G C T G G C G C A G A C C A T C A G G A A

C T C G C G G T G G T C G T C G C C G C A G A A C G T G A A G C C G A T C T A C A T C A T C A

C C C C C A C C A A C G C C T C G C A C A T C C A G T C C G C G G T G G T G T G C G G C C G C

15 C G G C A C G G C A T C C G C C T C C G C G T G C G G A G C G G C G G C C A C G A C T A C G A

G G G C C T G T C G T A C C G G T C T G A G A A A C C C G A G A C G T T C G C C G T C G T C G

A C C T C A A C A A G A T G C G G G C A G T G T C G G T C G A C G G C T A C G C C C G C A C G

G C G T G G G T C G A A T C C G G C G C G C A G C T C G G C G A G C T C T A C T A C G C G A T

20 C G C C A A G A A C A G C C C C G T G C T C G C G T T C C C G G C T G G C G T C T G C C C G T

C C A T C G G C G T C G G C G G C A A C T T C G C A G G C G G C G G C T T T G G C A T G C T G

C T G C G C A A G T A C G G C A T C G C C G C T G A G A A C G T C A T C G A C G T C A A G G T

G G T C G A C C C C A A C G G C A A G C T G C T C G A C A A G A G C T C C A T G A G C G C G G

25 A C C A C T T C T G G G C C G T T A G G G G C G G C G G C G G A G A G A G C T T T G G C A T C

G T C G T C T C G T G G C A G G T G A A G C T C C T G C C G G T G C C T C C C A C C G T G A C

C G T G C T C A A G A T C C C C A A G A C G G T G C A A G A A G G C G C C A T A G A C C T C G

T C A A C A A G T G G C A G C T G G T C G G G C C G G C A C T T C C C G G C G A C C T C A T G

30 A T C C G C A T C A T C C T T G C C G G G A A C A G C G C G A C G T T C G A G G C C A T G T A

C C T G G G C A C C T G C A G T A C C C T G A C G C C G C T G A T G A G C A G C A A A T T C C

C C G A G C T T G G C A T G A A C C C C T C G C A C T G C A A C G A G A T G T C C T G G A T C

A A G T C C A T C C C C T T C A T C C A C C T C G G C A A G C A G A A C C T C G A C G A C C T

35 C C T C A A C C G G A A C A A C A C C T T C A A A C C A T T C G C C G A A T A C A A G T C G G

A C T A C G T G T A C C A G C C C T T C C C C A A G C C C G T G T G G G A G C A G A T C T T C

- 22 -

GGCTGGCTTGTGAAGCCCGGCGCGGGGATCATGATCATGGACCCCTA
TGGCGCCACCATCAGCGCTACCCCCGAAGCGGCGACGCCGTTCCCTC
ACCGCCAGGGCGTCCTCTTCAACATCCAGTACGTCAACTACTGGTTC
5 GCTGAGTCAGCCGGCGCGGGCGCCGCTGCAGTGGAGCAAGGACATATA
CAAGTTCATGGAGCCGTACGTGAGCAAAAATCCCAGGCAGGCGTATG
CCAACTACAGGGACATCGACCTTGGCAGGAATGAGGTGGTGAACGAC
ATCTCCACCTACAGCAGCGGCAAAGTGTGGGGTGAGAAGTACTTCAA
10 GGGCAACTTCCAAAGGCTCGCCATTACCAAGGGCAAGGTGGATCCTC
AGGACTACTTCAGGAACGAGCAGAGCATCCCGCCACTGGTCGAGAAG
TACTGATCGAGGACCTTGCATGGAAATTTAGTGCGTGGTTGGCGTTT
CACAT

15

Abbildung 1(b)

20 AACTCGAGGGCCTTTGCTCTGGTGCCCCCTCCTCATCTGCGTCTTGTC
CTGCCACGCCGCGTCTCCTACGCGGCGGCGCCGGTGCCGGCCAAGG
AGGACTTCTTCGGATGCCTGGTGAAGGAGATACCGGCCCGCCTCCTC
TACGCCAAGAGCTCGCCTGCCTTCCCCACCGTCCTGGCGCAGACCAT
25 CAGGAACTCGCGGTGGTCGTCGCCGCAGAGCGTGAAGCCGCTCTACA
TCATCACCCCCACCAACGCCTCCACATCCAGTCCGCGGTGGTGTGC
GGCCGCCGGCACGGCGTCCGCATCCGCGTGCGGAGCGGCGGCCACGA
CTACGAGGGCCTGTCGTACCGGTCCGAGCGCCCCGAGGCGTTCGCCG
30 TCGTCGACCTCAACAAGATGCGGGCCGTGGTGGTTCGACGGCAAGGCT
CGCACGGCGTGGGTGGACTCCGGTGCGCAGCTCGGCGAGCTCTACTA
CGCCATCGCCAAGAACAGCCCCGTGCTCGCGTTCCCGGCCGGCGTTT
GCCCGACCATTTGGTGTAGGCGGCAACTTCGCTGGCGGCGGCTTCGGC
35 ATGCTGCTGCGCAAGTACGGCATCGCCGCCGAGAACGTCATCGACGT
GAAGGTGGTCGACGCCAACGGCACACTGCTCGACAAGAGCTCCATGA

- 23 -

5 GCGCGGATCACTTCTGGGCCGTCAGGGGCGGCGGCGGAGAGAGCTTC
GGCATCGTCTGTGTCGTGGCAGGTGAAGCTCCTCCCGGTGCCTCCCAC
CGTGACCGTGTTCAAGATCCCCAAGACGGTGCAAGAAGGCGCCGTAG
AGCTCATCAACAAGTGGCAGCTAGTCGCGCCGGCCCTCCCCGACGAC
CTGATGATCCGCATCATCGCTTTCGGCGGCACCGCCAAGTTCGAGGC
CATGTACCTGGGCACCTGCAAAGCCCTGACACCGCTGATGAGCAGCA
GATTCCCCGAGCTCGGCATGAACGCCTCGCACTGCAACGAGATGCCC
10 TGGATCAAGTCCGTCCCATTTCATCCACCTTGGCAAGCAGGCCACCCT
CTCCGACCTCCTCAACCGGAACAACACCTTCAAACCCTTCGCCGAGT
ACAAGTCGGACTACGTCTACCAGCCCGTCCCCAAGCCCGTCTGGGCG
CAGATCTTCGTCTGGCTCGTCAAACCCGGCGCCGGGATCATGGTCAT
15 GGACCCCTACGGCGCCGCCATCAGCGCCACCCCGAAGCCGCCACGC
CGTTCCCTCACCGCAAGGACGTCCTCTTCAACATCCAGTACGTCAAC
TACTGGTTCGACGAGGCAGGCGGCGCCGCGCCGCTGCAGTGGAGCAA
GGACATGTACAGGTTCATGGAGCCGTACGTCAGCAAGAACCCAGAC
20 AGGCCTACGCCAACTACAGGGACATCGACCTCGGCAGGAACGAGGTG
GTCAACGACATCTCCACCTATGCCAGCGGCAAGGTCTGGGGCGAGAA
GTACTTCAAGGGCAACTTCCAAGGCTCGCCATTACCAAGGGCAAGG
TGGATCCTCAGGACTACTTCAGGAACGAGCAGAGCATCCCGCCGCTG
25 CTAGGGAAGTAGTAGTACTCTTGCTTGCATGGAGATTTGTAGTGCCT
CTTTCGCGTTTCAAATGCCCAACTAGTAGAATAAGGATCGTGCGTA

30 **Abbildung 2(a)**

NYRAFALALLFCALSCQAAAAAYAPVPAKADFLGCLMKEIPARLLYA
KSSPDYPTVLAQTIRNSRWSSPQNVKPIYIITPTNASHIQSAVVCGR
35 RHGIRLRVRSGGHDIYGLSYRSEKPETFVVDLNMRAVSVDGYART
AWVESGAQLGELYAIAKNSPVLAFPAGVCPSIGVGGNFAGGGFGML

- 24 -

LRKYGIAAENVIDVKVVDPNGKLLDKSSMSADHFWAVRGGGGESFGI
VVSQVQVLLPVPPTVTVLKIPKTVQEGAILVNKWQLVGPALPGDLM
IRIILAGNSATFEAMYLGTCTLTPLMSSKFPELGMNPSHCNEMSWI
5 KSIPFIHLGKQNLDDLLNRNNTFKPFAEYKSDYVYQPFKPVWEQIF
GWLVKPGAGIMIMDPYGATISATPEAATPFPHRQGVLFNIQYVNYWF
AESAGAAPLQWSKDIYKFMEPYVSKNPRQAYANYRDIDLGRNEVVND
ISTYSSGKVWGEKYFKGNFQRLAITKGKVDPQDYFRNEQSIPPLVEK
10 Y

Abbildung 2(b)

15 NSRAFALVPLLICVLSCHAAVSYAAAPVPAKEDFFGCLVKEIPARLL
YAKSSPAFPTVLAQTIRNSRWSSPQSVKPLYIITPTNASHIQSAVVC
GRRHGVRI RVRSGGHDYEGLSYR SERPEAFVVDLNKMRAVVVDGKA
20 RTAWVD SGAQLGELYAIAKNSPVLAFFPAGVCPTIGVGGNFAGGGFG
MLLRKYGIAAENVIDVKVVDANGTLLDKSSMSADHFWAVRGGGGESF
GIVVSQVQVLLPVPPTVTVFKIPKTVQEGAVELINKWQLVAPALPDD
LMIRIIAFGGTAKFEAMYLGTCKALTPLMSSRFPELGMNASHCNEMP
25 WIKSVPFHLGKQATLSDLLNRNNTFKPFAEYKSDYVYQVPKPVWA
QIFVWLVKPGAGIMVMDPYGAAISATPEAATPFPHRKDVLFNIQYVN
YWFDEAGGAAPLQWSKDMYRFMEPYVSKNPRQAYANYRDIDLGRNEV
VNDISTYASGKVWGEKYFKGNFQRLAITKGKVDPQDYFRNEQSIPPL
30 LGK

35

Abbildung 3

AGCTCGAGGGCCTTCGCTCTGGTGCTCCTCCTCTGCGCCTTGTCCTG
5 CCACCACGCTGCCGTCTCCTCCGCGCAGGTGCCGGCCAAGGACGACT
TCCTGGGATGCCTCGTGAAGGAGATACCGGCCCGCCTCCTCTTCGCC
AAGAGCTCGCCTGCCTTCCCCGCCGTCTGGAGCAGACCATCAGGAA
CTCGCGGTGGTTCGTGCGCCGAGAACGTGAAGCCGCTCTACATCATCA
10 CCCCCACCAACACCTCCCACATCCAGTCTGCTGTGGTGTGCGGCCGC
CGGCACGGCGTCCGCCTCCGCGTGCGGAGCGGCGGCCACGACTACGA
GGCCTGTCTGTACCGGTCCGAGCGCCCCGAGGCGTTCGCCGTCTGTAG
ACCTCAACAAGATGCGGACCGTGTGGTCAACGAAAAGGCCCGCACG
15 GCGTGGGTGGACTCCGGCGCGCAGCTCGGCGAGCTCTACTACGCCAT
CGCCAAGAACAGCCCCGTGCTCGCGTTCCAGCCGGCGTTTGCCCGT
CCATTGGTGTAGGTGGCAACTTCGCTGGCGGCGGCTTCGGCATGCTG
CTGCGCAAGTACGGCATCGCCGCCGAGAACGTCATCGACGTCAAGCT
20 GGTGACGCCAACGGCAAGCTGCTCGACAAGAGCTCCATGAGCCCGG
ACCACTTCTGGGCCGTCAGGGGCGGCGGCGGAGAGAGCTTCGGCATC
GTCGTCTCGTGGCAGGTGAAGCTTCTCCCGGTGCCTCCCACCGTGAC
TGTGTTTCAGATCCCCAAGACAGTGCAAGAAGGCGCCGTAGACCTCA
25 TCAACAAGTGGCAGCTGGTTCGCGCCGGCCCTTCCCGGCGACATCATG
ATCCGCATCATCGCCATGGGGGACAAAGCGACGTTTCGAGGCCATGTA
CCTGGGCACCTGCAAAACCCTGACGCCGCTGATGAGCAGCAAATTCC
CGGAGCTTGGCATGAACCCCTCGCACTGCAACGAGATGCCCTGGATC
30 AAGTCCATCCCCTTCATCCACCTTGGCAAGCAGGCCACCCTGGCCGA
CCTCCTCAACCGGAACAACACCTTCAAACCCTTCGCCGAATACAAGT
CGGACTACGTCTACCAGCCCGTCCCCAAGCCCGTGTGGGAGCAGCTC
TTCGGCTGGCTCACGAAACCCGGCGCGGGGATCATGGTCATGGACCC
35 ATACGGCGCCACCATCAGCGCCACCCCCGAAGCGGCGACGCCGTTCC
CTCACCGCAAGGGCGTCCTCTTCAACATCCAGTACGTCAACTACTGG

- 26 -

5 TTCGCCGAGGCAGCCGGCGCCGCGCCGCTGCAGTGGAGCAAGGACAT
TTACAAATTCATGGAGCCGTTCTGTGAGCAAGAACCCAGGCAGGCGT
ACGCCAACTACAGGGACATCGACCTCGGCAGGAACGAGGTGGTGAAC
GACATCTCAACCTACAGCAGCGGCAAGGTGTGGGGCGAGAAGTACTT
CAAGGGCAACTTCCAAAGGCTCGCCATCACCAAGGGCAAGGTGGATC
CCCAGGACTACTTCAGGAACGAGCAGAGCATCCCGCCGCTGCTGGGC
AAGTAGTGACCGAGAGTCTTGCATGGAGATTTGTAGTGCGTGCTTGG
10 CGTTTCTGAT

Abbildung 4

15 SSRAFALVLLLCALSCHHAAVSSAQVPAKDDFLGCLVKEIPARLLFA
KSSPAFPVLEQTIRNSRWSSPQNVKPLYIITPTNTSHIQSAVVCGR
RHGVRLRVRSGGHDYEGLSYRSEPEAFVVDLNKMRTVLVNEKART
20 AWVDSGAQLGELYAIAKNSPVLAFPAGVCPSIGVGGNFAGGGFGML
LRKYGIAAENVIDVKLVDANGKLLDKSSMSPDHFVAVRGGGGESFGI
VVSQVQVLLPVPPTVTVFQIPKTVQEGAVDLINKWQLVAPALPGDIM
IRIIAMGDKATFEAMYLGTCKTLTPLMSSKFPELGMNPSHCNEMPWI
25 KSIPFIHLGKQATLADLLNRNNTFKPFAEYKSDYVYQVPKPVWEQL
FGWLTKEGAGIMVMDPYGATISATPEAATPEPHRKGVLFNIQYVNYW
FAEAAGAAPLQWSKDIYKFMEPFVSKNPRQAYANYRDIDLGRNEVVN
DISTYSSGKVWGEKYFKGNFQRLAITKGKVDPQDYFRNEQSIPPLLG
30 K

35

Abbildung 5(a)

AACTATAGGGCCTTCACGCTGGTGCTCCTCTTCTGCGCCTTGTCCTG
5 TCAAGCCGCCGCCACCTACGCGCCGGTGCCTGCCAAGGAGGACTTCC
TCGGATGCCTCATGAAGGAGATACCGGCACGCCTCCTCTACGCCAAG
AGCTCGCCTGACTTCCCCACCGTCCTGGCGCAGACCATCAGGAACTC
GCGGTGGTTGTGCGCCGAGAACGTGAAGCCGCTCTACATCATCACCC
10 CCACCAACGCCTCGCACATCCAGTCCGCGGTGGTGTGCGGACGCCGG
CACAGCGTCCGCCTCCGCGTCCGGAGCGGCGGCCACGACTACGAGGG
CCTGTCGTACCGGTCCGAGAAACCCGAGACGTTGCGCGTCGTGACC
TCAACAAGATGCGGGCAGTGTTGATCGACGGCTACGCCCCGCACGGCG
15 TGGGTCGAATCCGGCGCGCAGCTCGGCGAGCTCTACTACGCCATCGC
GAAAAACAGCCCCGTGCTCGCGTTCCCGGCCGGCGTCTGCCCCGACCA
TCGGCGTCGGCGGCAACTTCGCAGGCGGCGGCTTTGGCATGCTGCTG
CGGAAGTACGGCATCGCCGCCGAGAACGTCATCGACGTCAAGGTGGT
20 CGACCCCAACGGCAAGCTTCTCGACAAGAGCTCCATGAGCCCGGACC
ACTTCTGGGCCGTCAGGGGCGGCGGCGGAGAGAGCTTTGGCATCGTC
GTGTCGTGGCAAGTGAAGCTCCTGCCGGTGCCTCCCACCGTGACCGT
GTTCAAGATCCCCAAGACAGTGCAAGAAGGCGCCGTAGACCTCGTCA
25 ACAAGTGGCAACTGGTCGGGCGCGCCCTTCCCGGCGACCTCATGATC
CGCGTCATCGCTGCGGGGAACACCGCGACATTCGAGGGCATGTACCT
GGGCACCTGCCAAACCCTGACGCCGTTGATGAGCAGCCAATTCCCCG
AGCTTGGCATGAACCCCTATCACTGCAACGAGATGCCCTGGATCAAG
30 TCCATCCCCTTCATCCACCTCGGCAAAGAGGCCAGCCTGGTCGACCT
CCTCAACCGGAACAACACCTTCAAGCCCTTCGCCGAATACAAGTCGG
ACTACGTGTACCAGCCCTTCCCCAAGCCCGTGTGGGAGCAGATCTTC
GGCTGGCTCACGAAGCCCGGTGGGGGGATGATGATCATGGACCCATA
35 CGGCGCCACCATCAGCGCCACCCCCGAAGCGGCGACGCCGTTCCCTC
ACCGCCAGGGCGTTCTCTTCAACATCCAGTACGTCAACTACTGGTTC

- 28 -

5 GCGAGGCAGCCGCCGCCGCCGCTGCAGTGGAGCAAGGACATGTA
CAATTTTCATGGAGCCGTACGTGAGCAAGAACCCCAGGCAGGCGTACG
CCA ACTACAGGGACATTGACCTCGGCAGGAACGAGGTGGTGAACGAC
ATCTCAACCTATAGCAGCGGCAAGGTTTGGGGCGAGAAGTACTTCAA
GGGCAACTTCCAAAGGCTCGCTATTACCAAGGGCAAGGTGGATCCTC
AGGACTACTTCAGGAACGAGCAGAGCATCCCGCCGCTGCTCGAGAAG
TACTGATCGAGGACCTTGCATGGAGATTTAGTGCGTGGTTGCCGTTT
10 CACAT

Abbildung 5(b)

15 AACTGTAGGGCCTTCGCGCAGGTGCTCCTCTTCTTCGCCTTGTCCTG
CCAAGCCGCCGCCACCTACGCGCCGGTGCCCTGCCAAGGAGGACTTCC
TCGGATGCCTCATGAAGGAGATACCGGCCCGCCTCCTCTACGCCAAG
20 AGCTCGCCTGACTACCCCAACCGTGCTGGCGCAGACCATCAGGAACCTC
GCGGTGGTCGACGCAGCAGAACGTGAAGCCGCTGTACATCATCACCC
CCACCAACGCCTCCCACATCCAATCCGCGGTGGTGTGCGGCCGCCGG
CACGGCGTCCGCCTCCGCGTGCGGAGCGGCGGCCACGACTACGAGGG
25 CCTGTCGTACCGGTCCGAGAAACCCGAGACGTTTCGCCGTGTCGACC
TCAACAAGATGCGGGCAGTGGTTGTGCGACGGCTACGCCCCGCACGGCG
TGGGTGGAATCCGGCGCGCAGCTCGGCGAGCTCTACTACGCCATCGC
GAAGAACAGCCCCGTGCTCGCGTTCCCGGCCGGCGTCTGCCCCGTCCA
30 TCGGCGTTCGGCGGCAACTTCGCAGGCGGCGGCTTCGGCATGCTGCTG
CGCAAGTACGGCATCGCCGCCGAGAACGTCATCGACGTCAAGGTGGT
CGACCCCGACGGCAAGCTGCTCGACAAGAGCTCCATGAGCGCGGACC
ACTTCTGGGCCGTCAGGGGCGGCGGCGGAGAGAGCTTCGGCATCGTC
35 GTCTCGTGGCAGGTGAAGCTCATGCCAGTGCCCTCCCACCGTCACCGT
GTTTAAGATCCCCAAGACGGTGCAAGAAGGCGCCGTAGACCTCGTCA

- 29 -

ACAAGTGGCAGCTGGTCGGGCGGCACTTCCCGGCGACCTCATGATC
CGCGTCATCGCTGCCGGGAACACGGCGACGTTGAGGCCTTGTACCT
GGGCACCTGCAAAACCCTGACGCCGCTGATGAGCAGCCAATTCCCCG
5 AGCTTGGCATGAACCCCTATCACTGCAACGAGATGCCCTGGATCAAG
TCCGTCCCCTTCATCCACCTCGGCAAACAGGCTGGCCTGGACGACCT
CCTCAACCGGAACAACACCTTCAAGCCCTTCGCCGAATACAAGTCGG
ACTACGTGTACCAGCCCTTCCCCAAGCCCGTGTGGGAGCAGATCTTC
10 GGCTGGCTCGCGAAGCCCGGCGGGGATCATGATCATGGACCCCTA
CGGCGCCACCATCAGCGCCACCCCCGAAGCGGCGACGCCGTTCCCTC
ACCGCCAGGGCGTCCTCTTCAACATCCAGTATGTCAACTACTGGTTC
GCCGAGCCAGCCGGCGCCGCGCCGCTGCAGTGGAGCAAGGACATTTA
15 CAATTTTCATGGAGCCGTACGTGAGCAAGAACCCAGGCAGGCGTACG
CCAATAACAGGGACATCGACCTCGGCAGGAATGAGGTGGTGAACGAC
ATCTCAACCTACAGCAGCGGCAAGGTGTGGGGCGAGAAGTACTTCAA
GAGCAACTTCCAAAGGCTCGCCATTACCAAGGGCAAGGTAGATCCTC
20 AGGACTACTTCAGGAATGAGCAAAGCATCCCGCCGCTGATCGAGAAG
TACTGATCGAGGACCTTGCATGGAGATTTAGTGCGTGGTTGGCGTTT
CACAT

25

Abbildung 6(a)

NYRAFTLVLLFCALSCQAAATYAPVPAKEDFLGCLMKEIPARLLYAK
30 SSPDFPTVLAQTIRNSRWLSPQNVKPLYIITPTNASHIQSAVVCGRR
HSVRLRVRSGGHDYEGLSYRSEKPETFVVDLNMRAVLIDGYARTA
WVESGAQLGELYAIAKNSPVLAFPAGVCPTIGVGGNFAGGGFGMLL
RKYGIAAENVIDVKVDPNGKLLDKSSMSPDHFWAVRGGGGESFGIV
35 VSWQVKLLPVPPTVTVFKIPKTVQEGAVDLVNKWQLVGPALPGDLMI
RVIAAGNTATFEGMYLGTCQTLTPLMSSQFPELGMNPHYHCNEMPWIK

5 SIPFIIHLGKEASLVDLLNRNNTFKPFAEYKSDYVYQPFPPKPVWEQIF
GWLTKPGGGMMIMDPYGATISATPEAATPFPHRQGVLFNIQYVNYWF
AEAAAAAPLQWSKDMYNFMEPYVSKNPRQAYANYRDIDLGRNEVVND
ISTYSSGKVWGEKYFKGNFQRLAITKGKVDPQDYFRNEQSIPPLLEK
Y

10 **Abbildung 6(b)**

15 NCRAFAQVLLFFALSCQAAATYAPVPAKEDFLGCLMKEIPARLLYAK
SSPDYPTVLAQTIRNSRWSTQQNVKPLYIITPTNASHIQSAVVCGRR
HGVRLRVRSGGHDYEGLSYRSEKPETFAVVDLNKMRAVVVDGYARTA
WVESGAQLGELYAIAKNSPVLAFPAGVCPSIGVGGNFAGGGFGMLL
RKYGIAAENVIDVKVVDPDGKLLDKSSMSADHFWAVRGGGGESFGIV
VSWQVKLMPVPPTVTVFKIPKTVQEGAVDLVNKWQLVGPALPGDLMI
20 RVIAAGNTATFEALYLGTCCKTLTPLMSSQFPELGMNPHYHCNEMPWIK
SVPFIIHLGKQAGLDDLLNRNNTFKPFAEYKSDYVYQPFPPKPVWEQIF
GWLAKPGAGIMIMDPYGATISATPEAATPFPHRQGVLFNIQYVNYWF
AEPAGAAPLQWSKDIYNFMEPYVSKNPRQAYANYRDIDLGRNEVVND
25 ISTYSSGKVWGEKYFKSNFQRLAITKGKVDPQDYFRNEQSIPPLIEK
Y

30 **Abbildung 7**

35 tacttcccgccgcccggctgctaaagaagacttcctggggtgcctggt
taaagaaatcccgccgctgtgttgtagcggaatcgtcgccggcgct
atccctcagtcctggggcagaccatccggaactcgaggtggtcgtcg
ccggacaacgtgaagccgctctacatcatcacccccaccaacgtctc

- 31 -

ccacatccagtcgcgcgtggtgtgcggccgcccacagcgtccgca
tccgcgtgcgacgcggcgggcacgactacgagggcctctcgtaaccg
tctttgcagcccgcagacgttcgcccgtcgacctaacaagatgcg
5 ggcggtgtgggtggacggcaaggcccgcacggcgtgggtggactccg
gcgcgcagctcggcgagctctactacgccatctataaggcgagcccc
acgctggcgttcccggccggcgtgtgcccgcacgatcggagtgggcgg
caacttcgcggggcgggcgttcggcatgctgctgcgcaagtacggca
10 tcgccgcggagaacgtcatcgacgtgaagctcgtcgacgccaacggc
aagctgcacgacaagaagtccatgggcgcacgaccatttctgggcccgt
caggggcggcgggggcgagagcttcggcatcgtggtcgcgtggcagg
tgaagctcctgccggtgccgcccaccgtgacaatattcaagatctcc
15 aagacagtgagcgagggcgccgtggacatcatcaacaagtggcaagt
ggtcgcgcgcgcagcttcccgcgcacctaataatcgcgcacgcgc
aggggcccacaggccacgttcgaggccatgtacctcggcacctgcaaa
accctgacgcgcgttgatgagcagcaagttcccggagctcggcatgaa
20 cccctcccactgcaacgagatgtcatggatccagttccatccccttcg
tccacctcggccacagggacgccctcgaggacgacctcctcaaccgg
aacaactccttcaagcccttcgccgaatacaagtccgactacgtcta
ccagcccttccccaagaccgtctgggagcagatcctcaacacctggc
25 tcgtcaagcccggcgccgggatcatgatcttcgacccctacggcgcc
accatcagcgccacccccggagtccgccacgcccttccctcaccgcaa
gggcgtcctcttcaacatccagtacgtcaactactgggttcgccccgg
gagccgcccgcgcgccccctctcgtggagcaaggacatctacaactac
30 atggagccctacgtgagcaagaaccccaggcaggcgtacgcaaacta
cagggacatcgacctcggcaggaacgaggtgggtcaacgacgtctcca
cctacgccagcggcaaggtctggggccagaaataacttcaagggcaac
ttcgagaggctcgccattaccaagggcaaggtcgatcctaccgacta
35 cttcaggaacgagcagagcatcccgcgcgtcatcaaaaagtactga

Abbildung 8

5 YFPPPAAKEDFLGCLVKEIPPRLLYAKSSPAYPSVLGQTIRNSRWSS
PDNVKPLYIITPTNVSHIQSAVVCGRRH SVRIRVRSGGHDYEGLSYR
SLQPETF AVVDLNKMRAVWVDGKARTAWVD SGAQLGELY YAIYKASP
TLAFPAGVCPTIGVGGNFAGGGFGMLLRKYGIAAENVIDVKLVDANG
10 KLHDKKSMGDDHFWAVRGGGGESFGIVVAWQVKLLPVPPTVTIFKIS
KTVSEGAVDIINKWQVVAPQLPADLMIRIIAQGPKATFEAMYLGTCK
TLTPLMSSKFPELGMNPSHCNEMSWIQSIPFVHLGHRDALEDDLNR
NNSFKPFAEYKSDYVYQPFPKTVWEQILNTWLVKPGAGIMIFDPYGA
15 TISATPESATPFPHRKGVLFN IQYVNYWFAPGAAAAPLSWSKDIYNY
MEPYVSKNPRQAYANYRDIDLGRNEVVNDVSTYASGKVWGQKYFKGN
FERLAITKGKVDPTDYFRNEQSIPPLIKKY

20

25

30

35

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record.

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☒ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.